

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 2 月 1 0 日
Date of Application:

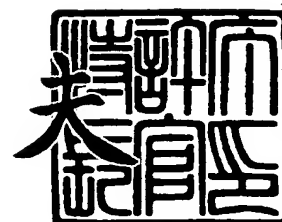
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 5 8 6 9 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 5 8 6 9 8]

出 願 人 花王株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



【書類名】 特許願

【整理番号】 020962JP

【提出日】 平成14年12月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都墨田区文花 2 - 1 - 3 花王株式会社研究所内

 【氏名】 岩瀬 忠行

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都墨田区文花 2 - 1 - 3 花王株式会社研究所内

 【氏名】 板野 守秀

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都墨田区文花 2 - 1 - 3 花王株式会社研究所内

 【氏名】 矢納 義高

【特許出願人】

 【識別番号】 000000918

 【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100101203

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 山下 昭彦

 【電話番号】 03-5524-2323

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108800

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 星野 哲郎

 【電話番号】 03-5524-2323

【選任した代理人】

【識別番号】 100104499

【弁理士】

【氏名又は名称】 岸本 達人

【電話番号】 03-5524-2323

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 131924

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0209535

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマー及びその検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記塩基配列（A）と（B）とを含むPCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマー。

（A）配列番号1に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列に含まれる、10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列

（B）配列番号1に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列

【請求項2】 下記塩基配列（C）と請求項1記載の塩基配列（B）とを含むPCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出用プライマー。

（C）配列番号1に記載の第1番目乃至第18番目の塩基配列

【請求項3】 請求項1又は請求項2に記載のプライマーを用いたPCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

【請求項4】 前記塩基配列（A）又は（C）をフォワードプライマーとし、前記塩基配列（B）をリバースプライマーとした請求項3に記載のフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

【請求項5】 請求項1に記載の塩基配列（A）と下記塩基配列（D）とを含むPCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の定量用プライマー。

（D）配列番号1に記載の塩基番号第124番目乃至156番目の塩基配列に含まれる、10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列の相補的塩基配列

【請求項6】 請求項1に記載の塩基配列（A）と下記塩基配列（E）とを含むPCR法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の定量用プライマー。

（E）配列番号1に記載の塩基番号第124番目乃至143番目の相補的塩基配列

【請求項7】 請求項5又は請求項6に記載の塩基配列（A）をフォワードプライマーとし、請求項5に記載の塩基配列（D）又は請求項6に記載の塩基配

列 (E) をリバースプライマーとする P C R 法によるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌を定量する方法。

【請求項 8】 請求項 1 に記載の塩基配列 (A) と (B) とを含むプライマーを用いて P C R を行う第 1 ステップと、

前記第 1 ステップによって増幅された産物を鋳型として用い、請求項 5 に記載の塩基配列 (A) および (D) を含むプライマーを用いて P C R を行う第 2 ステップと、

からなるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

【請求項 9】 配列番号 2 に記載の塩基配列の一部と請求項 1 に記載の塩基配列 (B) とを含むプライマーを用いて P C R を行う第 1 ステップと、

前記第 1 ステップによって増幅された産物を鋳型として用い、請求項 5 に記載の塩基配列 (A) および (D) を含むプライマーを用いて P C R を行う第 2 ステップと、

からなるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の検出方法。

【請求項 10】 請求項 1 に記載のプライマーを用いたフゾバクテリウム・ニュークレタム菌に特異的な遺伝子増幅産物。

【請求項 11】 請求項 10 の遺伝子増幅産物であって、配列番号 1 に記載のプローブ。

【請求項 12】 請求項 5 に記載のプライマーを用いたフゾバクテリウム・ニュークレタム菌に特異的な遺伝子増幅産物。

【請求項 13】 請求項 12 の遺伝子産物であって、配列番号 3 に記載のプローブ。

【請求項 14】 前記プローブは、標識物質によって標識される請求項 11 又は請求項 13 に記載のプローブ。

【請求項 15】 前記標識物質が、ビオチン、ジコキシゲニン、F I T C、アクリジン、ジニトロフェニル、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $[^3\text{H}]$ d N T P である請求項 14 に記載のプローブ。

【請求項 16】 請求項 1 もしくは請求項 5 に記載のプライマー対又は請求項 11 もしくは請求項 13 に記載のプローブを含むフゾバクテリウム・ニューク

レタム菌検出又は同定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、歯肉縁上歯垢や歯肉縁下歯垢、舌苔、唾液、歯肉溝滲出液、血液、髄液、化膿部位やその他組織等の生体試料中から化膿性疾患関連細菌及び口臭原因菌であるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌を特異的に検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

口臭を発生させる微生物（細菌）として、フゾバクテリウム属の中のフゾバクテリウム・ニュークレタム菌（*Fusobacterium nucleatum*、以下、F n 菌という。）がよく知られている。またヒト口腔から分離されるその他のフゾバクテリウム属として、フゾバクテリウム・ナヴィフォルム（*F. naviforme*）、フゾバクテリウム・ペリオドンティカム（*F. periodonticum*）、フゾバクテリウム・ネクロフォーラム（*F. necrophorum*）やフゾバクテリウム・ヴァリウム（*F. varium*）およびフゾバクテリウム・ルージー（*F. russii*）等が知られている。

【0003】

F n 菌は $0.4 \sim 0.7 \times 3.0 \sim 10 \mu\text{m}$ のグラム陰性の嫌気性桿菌である。両端は尖塔状で、ときに紡錘菌の名で呼ばれることがある。内毒素リポポリサッカライド（LPS）の存在が確認されていることや、ヒトや種々の動物の血球を凝集する性質がある。特に慢性歯周炎（成人性歯周炎）や壊死性歯周疾患（急性壊死性潰瘍性歯肉炎）病巣においてこの菌の増加が認められる。さらには体のいろいろな場所における化膿性病巣からも分離される。

【0004】

口腔内に存在するF n 菌は、食物残渣や剥離粘膜等に含まれる含硫アミノ酸や含硫アミノ酸を含むペプチド等を分解し揮発性硫化化合物（以下VSCという）を産生する。VSCとは、硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイト等からなり、口臭の本体とされている。そのためF n 菌は口臭原因菌とも言わ

れている。

【 0 0 0 5 】

しかし、F n 菌以外の前記フゾバクテリウム属の菌の V S C 産生能は F n 菌ほど高くない。また、F n 菌は、歯周病原菌であるポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) やプレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*) 等の歯周病原菌と共凝集するという特有の性質を有するため、歯周疾患との関連も示唆されている。

【 0 0 0 6 】

そのため、フゾバクテリウム属の中で F n 菌は特に重要な菌種である。しかし、F n 菌は、フゾバクテリウム属の他の菌と極めて近い類縁関係にあるため、それを分離培養することが困難であり、これまでに F n 菌だけを検出することのできる選択培地は開発されていない。そのため F n 菌を検出するために、生体試料を変法 F M 培地 (日水製薬株式会社製) 等に播種し、フゾバクテリウム属菌全てについて増殖培養、分離培養等を行ってシングルコロニーを生育させる必要がある。かかるシングルコロニーを生育させたための期間として、少なくとも 2 ~ 5 日は要する。さらに、その後、単離した菌を増殖させ、形態観察、グラム染色等による細胞染色、およびプロピオン酸産生試験、糖資化性等多くの生化学的性状を調べることにより、単離した F n 菌の同定を行う必要がある。このように、従来法による F n 菌の単離には、多岐にわたる同定試験が必要とされ、繁雑でかつ設備も時間も費用もかかる。

【 0 0 0 7 】

また、これら一般に行われている同定試験に加え、単離した菌から DNA を抽出し、それを膜上あるいは他の支持体上に固定し、標準菌の DNA をプローブとしてハイブリッド結合することにより、菌種を同定する方法があるが、この方法も数日を必要とし、さらに十分な検出感度及び選択性を得るのが難しいという問題があった。

【 0 0 0 8 】

P C R (Polymerase Chain Reaction) 法は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応で、迅速・高感度で高い特異性を持ち、かつ、簡便であることから、遺伝学

的分野のみならず、近年は医療分野や食品分野においても様々な応用が試みられている。

【0009】

以下に、PCR法の概略を述べる。2本鎖のDNAを鋳型とし、加熱して1本鎖DNAに分離（熱変性）した後、標的領域を挟むように、プライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを各相補鎖にハイブリッド結合させる（アニーリング）。基質である4種類のdNTP（デオキシリボヌクレオチド3リン酸）の存在下、DNAポリメラーゼを作用させると、このプライマーの3'末端に鋳型の塩基配列に従ってヌクレオチドが添加されDNA鎖が伸長する（伸長反応）。この反応を繰り返すことで、標的領域を含むDNA断片を大量に得ることができる。

【0010】

PCR法の応用として、特に医療分野や食品分野では、迅速な細菌検出同定法として検討されている。その中、16S rRNAをコードするDNA（rDNA）の配列の一部を利用して、細菌を検出・同定する研究が行われている。

【0011】

Fn菌種を検出同定するための試みとして、検体となる微生物の16S rDNAを抽出し、このDNAと相補関係にある数十の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法による細菌の検出方法が報告されている（非特許文献1を参照）。しかしながら、前記PCR法による細菌の検出に用いられている16S rDNAの塩基配列は、フゾバクテリム属において相同性が極めて高いため、Fn菌のみを検出することはできないという問題があった。

【0012】

また、「PCR法による新規口腔内細菌（Molecular Oral Bacteria）の検出」が報告されている（非特許文献2）。非特許文献2には、「16S rDNAクローンライブラリーの解析によって得られた結果を基に、5菌群のMolecular Oral Bacteriaを標的として菌群特異的プライマーを作成し、歯肉縁下歯垢および唾液からの検出を試みた。得られた増幅産物をクローニングし、その配列を決定した結果、増幅産物は全て標的菌群であり、作成したプライマーは、実際の臨床材料でも有効であることが明らかとなった」ことが報告されている。しかし、

これは、あくまで菌群を対象としたものであり、菌種までの検出・同定はなされていない。

【0013】

フゾバクテリウム属の場合、23S rRNAをコードするDNAの中に、近縁種と区別し得る塩基配列が存在する。そのため、23S rDNAに相補的なオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法によりFn菌を検出することも考えられる。しかし、Fn菌の23S rDNAの塩基配列は、ヒトDNAの塩基配列との相同性が高い。そのため、23S rDNAを利用したPCR法による細菌の検出法ではヒト由来DNAとFn菌由来のDNAを区別して検出することができないという問題がある。

【0014】

一方、16S rDNAと23S rDNAの間にはスペーサー領域とよばれる遺伝子が存在し（図1参照）、微生物種に特異的な遺伝子配列を有することが知られている。このスペーサー領域の塩基配列を利用した微生物検出法として、アコレプラズマ（*Acholeplasma*）の検出に関わる特許文献1等がある。

【0015】

またFn菌に存在するタンパク質をコードする遺伝子を利用した検出例が報告されている（非特許文献3）。非特許文献3には、Fn菌に発現するタンパク質（Fev 1）を検出することによって、Fn菌を同定する方法が報告されている。しかし、前記タンパク質（Fev 1）がFn菌にのみ存在しているか否かは明らかではない。そのため、生体試料の中から前記タンパク質（Fev 1）が検出された場合に、直ちにFn菌が存在するということは困難である。

【0016】

【非特許文献1】

Conrads, G. et al, J. Endodontics. 25:433-438. 1997

【非特許文献2】

URL: <http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/pamphlet/annual/2000/pdf00/300-1.pdf>

【非特許文献3】

Bolstad, A.I. & Jensen, H.B., J. Clin. Microbiol. 31:528-532. 1993

【0017】

【特許文献1】

特開平6-98800号公報

【0018】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、フゾバクテリウム属細菌の中でF n 菌を特異的に区別し、かつ、生体試料に混入されるヒト由来DNAと明確に区別しうる簡便かつ迅速な検出方法を提供することを目的とする。

また、本発明は、F n 菌に特異的な塩基配列が、16S rDNAと23S rDNAとの間のスペーサー領域を利用することにより特異性の高い検出方法を提供することをも目的とする。

【0019】

【課題を解決するための手段】

下記塩基配列のうち(A)と(B)、もしくは(A)と(D)を組み合わせたプライマー対を用いてPCRを行うことで、生体試料からF n 菌を特異的に検出できる。

(A) 配列番号1に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列に含まれる、10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列

(B) 配列番号1に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列

(D) 配列番号1に記載の塩基番号第124番目乃至156番目の塩基配列に含まれる、10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列の相補的塩基配列

【0020】

F n 菌のrDNAは、16S rDNA-スペーサー領域-23S rDNA-スペーサー領域-5S rDNAで構成されている(図1参照)。塩基配列の相同性の高いフゾバクテリウム属の菌種の中で、F n 菌だけに特異的な遺伝子の特定塩基配列が、塩基配列(B)に該当する配列番号1に記載の塩基番号第863番目

乃至 883 番目の塩基配列と、塩基配列 (D) に該当する配列番号 1 に記載の塩基番号第 124 番目乃至 156 番目の塩基配列との 2 箇所に存在する。塩基配列 (B) は 23 S r DNA 部位中に存在し、塩基配列 (D) は 16 S r DNA と 23 S r DNA との間のスペーサー領域と呼ばれる部位に存在する。

【0021】

F n 菌由来 DNA だけでなく、ヒト由来 DNA が含まれている生体試料の P C R を行うため、前記塩基配列になるべく近く、なおかつ一般細菌とヒト由来 DNA を区別する領域として、塩基配列 (A) に該当する配列番号 1 に記載の塩基番号第 1 番目乃至 39 番目の塩基配列を見出した。この塩基配列は、16 S r DNA の 3' 末端の 5 塩基および、前記 5 塩基に隣接する 16 S r DNA と 23 S r DNA との間に構成されるスペーサー領域の 5' 末端の塩基配列からなる部位に存在していた。

【0022】

次に P C R 法で増幅するための前記 3 部位のオリゴヌクレオチドプライマーを設計し合成した。これらのプライマーを用いて、F n 菌が存在する生体試料について P C R を行うとき、F n 菌に特異的な増幅産物のみが得られる。

【0023】

【発明の実施の形態】

F n 菌検出可能な検体としては、歯肉縁上歯垢や歯肉縁下歯垢、舌苔、唾液、歯肉溝滲出液等の口腔関連の生体試料を用いることができる。さらには血液、髄液、化膿部位やその他組織等の生体試料でもよい。また、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは化学合成されたものでも天然物由来のものでも使用可能である。

【0024】

以下、本発明の P C R 法に用いるプライマーについて説明する。塩基配列 (A) に該当する、配列番号 1 に記載の塩基番号第 1 番目乃至第 39 番目の塩基配列に含まれる、10 塩基以上の連続したヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして用い、塩基配列 (B) に該当する、配列番号 1 に記載の塩基番号第 863 番目乃至 883 番目の塩基配列の相補的塩基配列を含む

オリゴヌクレオチドをリバースプライマーとしてPCRを行うことができる。プライマーの鎖長としては、10塩基以上40塩基以下のものが使用され、好ましくは12塩基以上30塩基以下であり、より好ましくは15塩基以上25塩基以下である。塩基配列(A)は39塩基からなるものであってもよく、プライマーとしてより好適な15~25塩基、例えば18塩基からなる塩基配列(C) A A C G T G C G G A T G G A T C A C等を用いることが好ましい。これらのプライマーを用いてPCRを行った場合、配列番号1の塩基配列の増幅産物を特異的に得ることができる。主要な増幅産物の鎖長は、計算上883bpであり、電気泳動像で増幅産物を示す約900bpのバンドが確認できる(図2参照)。

【0025】

また、フォワードプライマーとして前記塩基配列(A)を含むオリゴヌクレオチドを用い、リバースプライマーとして塩基配列(D)に該当する配列番号1に記載の塩基番号第124番目乃至156番目の塩基配列に含まれる、10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列の相補的塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを用いることもできる。塩基配列(D)は29塩基からなるものであってもよく、プライマーとしてより好適な15~25塩基、例えば20塩基からなる塩基配列(E)等を用いることが好ましい。これらのプライマーを用いてPCRを行った場合、配列番号3に記載の塩基配列の増幅産物を特異的に得ることができる。この場合の主要な増幅産物の鎖長は、計算上143bpであり、電気泳動像で増幅産物を示す約150bpのバンドが確認できる(図3参照)。このプライマーを用いたときの増幅産物の鎖長は短いため、核酸定量試薬を加えた定量PCR法に最適である。核酸定量試薬としては、SYBR Green (Molecular Probe社製)やエチジウムブロマイド、 $[^3\text{H}]\text{dNTP}$ 等を用いることができる。核酸試薬を使わない方法として、リアルタイムPCRシステムを用いることもできる。もちろん、(A)の塩基配列と(B)の相補的塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして定量PCRに用いることもできる。

【0026】

プライマー鎖長が前記の(B)(C)(E)の塩基配列より5'末端が長いものを用いたときには、プライマー鎖長追加分が増幅産物に賦与される。逆に、5

・ 末端が短いものを用いたときには、その欠失分だけ増幅産物が短くなる。プライマーは、ビオチン、ジコキシゲニン、FITC (Fluorecein Isothiocyanate)、アクリジン、ジニトロフェニル、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、 $[^3\text{2P}]d\text{NTP}$ から一つ以上を用いて標識されてもよい。

【0027】

また、試料中の F_n 菌数が極めて少ない場合や、より明瞭な電気泳動像を得たい場合には、前記 (A) (B) (D) の3つのプライマーを用いてセミネスティットPCR法を行うことができる。セミネスティットPCR法は2段階の増幅ステップからなる。先ず第1の増幅ステップで標的領域を含んだ増幅産物を得る。そして得られた増幅産物を鋳型に第2の増幅ステップを行うが、この時最初に使用したプライマー（アウタープライマー）位置より、どちらか一方のプライマーだけ内側のプライマー（インナープライマー）を使用し、標的領域以外のDNA由来の増幅産物を除外することができる。第1の増幅ステップとして、前記 (A) および (B) の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをアウタープライマーとしてPCRを行う。増幅処理を行ったサンプルの一部を用いて第2の増幅ステップに入る。第2の増幅ステップでは、前記 (A) および (D) の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをインナープライマーとして用いPCRを行う。この場合の主要な増幅産物は、第2の増幅ステップで用いたプライマーに依存するため、配列番号3に記載の塩基配列の一部に相当する。

【0028】

第1の増幅ステップに用いることのできるアウタープライマーとして、前記 (A) の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドの他に、16SrDNAの塩基配列を基に設計した例えばCGTCACACCCACGAGAGTTGG（配列番号2に記載の塩基番号第1384番目乃至第1403番目の塩基配列）等を用いることもできる。あるいは (B) の塩基配列を含むプライマーの他に23SrDNAの塩基配列を基に設計した例えばCCATTGTGGTGATGGC（配列番号1に記載の塩基番号第760番目乃至第775番目の塩基配列）の相補的塩基配列をアウタープライマーとして用いることができる。

【0029】

本発明のプライマーはネステッドPCR法にも適用が可能である。ネステッドPCR法は、セミネステッドPCR法と比較して、両側とも内側のインナープライマー対を使用する点異なる。例えば、アウタープライマーとして、前記(C)と(B)の塩基配列のオリゴヌクレオチドを用い、第1の増幅ステップを行う。その後、前記(A)の塩基配列に含まれるCTCCTTTCTAAGGAGAA TGTG(配列番号1に記載の塩基番号第19番目乃至第39番目の塩基配列)および前記(E)の塩基配列のオリゴヌクレオチドをインナープライマーとして用いて第2の増幅ステップを行う。この場合の主要な増幅産物は、第2の増幅ステップで用いたプライマーに依存するため、配列番号3に記載の塩基番号第19番目乃至第143番目の塩基配列が増幅されるため、その鎖長は125bpである。

【0030】

ネステッドPCR法に使用可能なアウタープライマーとして、前記の(C)や(B)の塩基配列の他に、下記のことを挙げるができる。

フォワードプライマー：配列番号2に記載の塩基配列又は配列番号1に記載の塩基番号第1番目乃至第123番目の塩基配列に含まれる10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列

リバースプライマー：配列番号1に記載の塩基番号第40番目乃至第883番目又は23SrDNAに含まれる10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列の相補的塩基配列

例えば、アウタープライマーとして、16SrDNAの塩基配列を基に設計したCGTCACACCACGAGAGTTGG(配列番号2に記載の塩基番号第1384番目乃至第1403番目の塩基配列)と、23SrDNAの塩基配列のうち、AAGAAGGGTAACCGACTTの相補的塩基配列とを用いて第1ステップの増幅を行うことができる。この場合、Fn菌を特異的に検出するためには、本発明の塩基配列(A)と(B)の対プライマー又は(B)と(D)の対プライマーをインナープライマーとして用いることが好ましい。

【0031】

PCRにおける温度条件は、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を90～

98℃、プライマー鋳型DNAにハイブリッド結合させるアニーリング反応を37～65℃、Taq DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を50～75℃で行い、これを1サイクルとする。このようなサイクルを数十サイクル行わせることにより、標的配列を増幅させることができる。PCR後、増幅産物を電気泳動等により分離し、エチジウムブロマイド等で核酸染色を行い、増幅されたポリヌクレオチド配列の鎖長が、上述の標的配列の鎖長と等しければ検体中に検出対象の菌が存在すると判定できる。増幅されたポリヌクレオチド配列の検出には、高速液体クロマトグラフィーも有効である。

【0032】

本発明のオリゴヌクレオチドプローブはDNAでもRNAでもよい。RNAの場合はチミジン残基がウリジン残基に置換される。また、プライマー合成に当たり、任意のチミジン残基をウリジン残基に置換してもよいし、鎖長反応の基質としてdNTP中のdTTPの代わりにdUTPを用いても良い。

【0033】

本発明に供するサンプルとして、様々な生体試料が考えられるが、例えば唾液、舌苔、歯肉縁上歯垢、歯肉縁下歯垢、口腔内粘膜、歯肉溝滲出液、血液、髄液、化膿性疾患部位の検体、糞便、尿、あるいはそれら生体試料の培養物等を挙げることができる。

【0034】

採取した生体試料は、直接あるいはDNA抽出後PCRに供することができる。DNA抽出は、常法に従って行うことができる。例えば、アルカリ抽出もしくは界面活性剤抽出、酵素処理、ボーリング法等のうちいずれか一つ以上の方法、もしくは市販のキットを用いてDNA抽出を行う。

【0035】

生体から抽出されたDNAを含む試料は、常法に従って更に精製処理をしてもよい。例えば高速液体クロマトグラフィーもしくはアルコール沈殿、塩析、シリカゲルカラム、シリカゲルメンブレン等のうちいずれか一つ以上の方法、もしくは市販のキットを用いて、DNA精製する。

【0036】

前記のプライマーや増幅産物は、F n 菌検出のためのプローブとしても有用である。増幅産物は制限酵素等を用いて、適当な長さのDNA断片にしてもよい。制限酵素としてEcoR I、Mse I、Ban II、Alu I、Mbo I、Fok I、Taq I、Mbo II、Hinf I、Ava IIから一つ以上を用いることができる。制限酵素処理して得られたDNA断片は、電気泳動や高速液体クロマトグラフィー、シリカゲルカラム、シリカゲルメンブレン、ナイロンメンブレン等を用いて精製することが望ましい。

【0037】

これらのプローブは標識物質で標識することも可能である。標識物質としてビオチン、ジコキシゲニン、FITC (Fluorecein Isothiocyanate)、アクリジン、ジニトロフェニル、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、 $[^{32}\text{P}]$ dNTP から一つ以上を用いてプローブを標識することが可能である。

【0038】

これらプローブは支持担体に結合させ、DNAチップとして用いることができる。DNAチップの作製等については、常法に従って実施することができる。例えば、プローブをチップ基板上に配置させるプローブ配置型や、ガラスやシリコンなどの基板上で直接DNAの伸長反応を用いてプローブDNAを生成させたプローブ合成型などを用いてもよい。また、市販のDNAチップ作製装置及びその読み取りには、DNAチップ読み取り装置等を用いてもよい。

【0039】

菌検出又は同定用キットは、本発明のプローブおよび／またはプライマーを含む。さらに他の成分としてTaq DNAポリメラーゼ、その他の酵素、dNTP等の基質、緩衝液等を含む。

【0040】

【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

<実施例1> F n 菌の検出1

下記プライマーを用いて、フゾバクテリウム・ニュークレタム標準菌の検出を

行った。

フォワードプライマー: 5' —AACGTGCGGATGGATCAC—3'

リバースプライマー: 5' —CTACGCCAAACGACTAATTCG—3'

【0041】

3種類のフゾバクテリウム・ニュークレタム菌標準株 (*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586、ATCC 10953、ATCC 23726)

を、変法FM培地 (日水製薬株式会社製) 上にて3~5日間37℃で嫌気培養を行い、出現したコロニーを1白金耳分採取し市販キット (キアゲン社製DNAミニキット) を用いてDNA抽出液を得た。DNA抽出液1 μ lに50 mMのMgCl₂ 溶液を1.5 μ l、各2 mMのdNTP溶液 (アプライドバイオシステム社製) 2 μ l、12.5 pmol/ μ lのフォワードプライマー溶液1 μ l、12.5 pmol/ μ lのリバースプライマー溶液1 μ l、5 U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ溶液 (アプライドバイオシステム社製) 0.5 μ l、Ampli Taq Gold緩衝液 (アプライドバイオシステム社製) 5 μ lをそれぞれ加え、更に滅菌した超純水を50 μ lになるよう加えて反応液とした。

【0042】

PCRの反応条件は、以下の通りである。

熱変性: 94℃、30秒

アニーリング: 55℃、30秒

伸長反応: 72℃、30秒

を40回行った。

【0043】

これらの操作は、アプライド・バイオシステム社製のGeneAmp 9700システムを用いて行った。増幅産物の有無は、常法のアガロース電気泳動法に従った。電気泳動のためのアガロースゲルを用意し予めTAE (Tris-acetate, Ethylenediamine-Tetraacetic Acid) バッファーを満たした泳動装置にセットし、PCR反応物を試料溝にセットした。100 V、15分間泳動した後、アガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液に30分浸漬し、核酸を染色した。染色後、UVトラン

スイルミネーターを用いて、増幅産物のバンドを確認した。電気泳動の結果は図 2 の通りである。図中のレーン 1 はマーカー、レーン 2 は ATCC 25586 株、レーン 3 は ATCC 10953 株、レーン 4 は ATCC 23726 株の電気泳動像を示す。3 菌種のフゾバクテリウム・ニュークレタム菌全てに約 900 bp の増幅産物を示すバンドが認められた。

【0044】

<実施例 2> F n 菌の検出 2

下記プライマーを用いて、実施例 1 同様の試験を行った。

本実施例で用いたプライマー

フォワードプライマー: 5' —AACGTGCGGATGGATCAC—3'

リバースプライマー: 5' —TCTAAAGAAATTGTTTAGAG—3'

【0045】

電気泳動の結果は図 3 の通りである。図中のレーン 1 はマーカー、レーン 2 は ATCC 25586 株、レーン 3 は ATCC 10953 株、レーン 4 は ATCC 23726 株の電気泳動像を示す。3 菌種のフゾバクテリウム・ニュークレタム菌全てに約 140 bp の増幅産物を示すバンドが認められた。

【0046】

<比較例 1> F n 菌以外のフゾバクテリウム属細菌およびヒト由来細胞の PCR

供試菌体および供試細胞はとして、F n 菌以外の 5 菌種、すなわちフゾバクテリウム・ナヴィフォルム (F. naviforme ATCC 25832)、フゾバクテリウム・ペリオドンティカム (F. periodonticum ATCC 33693)、フゾバクテリウム・ネクロフォーラム (F. necrophorum ATCC 25286) やフゾバクテリウム・ヴァリウム (F. varium ATCC 8501) フゾバクテリウム・ルージー (F. russii ACTT 25533) と、ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞 (Normal Gingiva Fibroblast ATCC CRL 1292) を供試した。

【0047】

ヒト由来正常歯肉繊維芽細胞は、改良イーグルス培地 (Dulbecco社製) に 10

%のウシ胎児血清を加えた培地中で、5%CO₂の気相条件で、37℃、72時間培養後回収し、生理食塩水で洗浄後DNA抽出を行った。それ以外の菌株については、実施例1同様の操作を行った。電気泳動の結果は図4の通りである。レーン1はマーカー、レーン2はフゾバクテリウム・ナヴィフォルム、レーン3はフゾバクテリウム・ペリオドンティカム、レーン4はフゾバクテリウム・ネクロフォーラム、レーン5はフゾバクテリウム・ヴァリウム、レーン6はフゾバクテリウム・ルージー、レーン7はヒト由来正常歯肉繊維芽細胞の電気泳動像を示す。いずれのレーンにも増幅産物を示すバンドは認められなかった。

【0048】

<実施例3>生体試料のPCRの実施

1. 試料の調製

被験者5名から生体試料として、唾液、舌苔、歯肉縁下歯垢および口腔粘膜を採取した。それぞれの採取方法は下記の通りである。

【0049】

(1) 唾液の場合

1mlの唾液を採取し、5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て、PBS (phosphate buffered saline: 磷酸緩衝生理食塩水) 1mlを加え、再懸濁した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

【0050】

(2) 舌苔の場合

舌ブラシで舌を擦過し、舌苔を採取した。得られた舌苔中10mgを分取し、これに1mlのPBSを加えて懸濁後5000gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1mlのPBSを加え再懸濁後5000gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをDNA抽出に供試した。

【0051】

(3) 歯肉縁下歯垢の場合

歯周ポケット1部位に対しペーパーポイント (United Dental Manufacturers Inc. 製) 2本を差込み、歯肉縁下歯垢を採取した。このペーパーポイントを1mlのPBS中で強く1分間攪拌ボルテックスし、付着物を回収した。ペーパー

ポイントを取り除いた後、懸濁液を5000 gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1 m lのP B Sを加え再懸濁後5000 gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをD N A抽出に供試した。

【 0 0 5 2 】

(4) 口腔粘膜の場合

シードスワブを用いて、頬粘膜を採取した。採取物を1 m lのP B Sにて懸濁した。懸濁液を5000 gで5分間遠心分離した。上清を捨て更に1 m lのP B Sを加え再懸濁後5000 gで5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返し、洗浄したものをD N A抽出に供試した。

【 0 0 5 3 】

それ以外は、実施例1同様の操作を行った。電気泳動の結果は図5 (1) ~ (4)の通りである。図5 (1)は唾液からの検出結果、図5 (2)は舌苔からの検出結果、図5 (3)は歯肉縁下歯垢からの検出結果、図5 (4)は口腔粘膜からの検出結果を示す。各図のレーン1はマーカー、レーン2は被験者A、レーン3は被験者B、レーン4は被験者C、レーン5は被験者D、レーン6は被験者Eからの採取試料の電気泳動像を示す。唾液に関しては、5名中3名に、舌苔に関しては、5名中4名に、歯肉縁下歯垢に関しては5名全員に、口腔粘膜に関しては5名中1名に約9 0 0 b pのバンドが認められた。

【 0 0 5 4 】

<実施例4>生体試料の定量P C Rの実施

実施例3の歯肉縁下歯垢試料を用いて、定量P C Rを行った。核酸定量試薬としてSYBR Green (Molecular Probe社製)を3 0 0 0倍希釈したものを5 μ l供試した。実施例2に記載のプライマーを1 2 . 5 p Mの濃度になるように滅菌した超純水で希釈したものを1 μ l用いた。それ以外の試薬は実施例1の反応液組成の通りである。これらを混ぜ合わせて反応液を調製し、アプライドバイオシステム社製A B I プリズム 7 0 0 0 システムを用いて定量P C Rを行った。結果を表1に示した。

【 0 0 5 5 】

【表 1】

被験者	細菌数 (copies / 採取部位)
A	1.9E+04
B	5.8E+06
C	2.5E+04
D	3.1E+02
E	8.0E+01

【0056】

<実施例 5>生体試料のセミネスティットPCRの実施

下記のプライマーを用いて、2段階のPCRから成るセミネスティットPCRを行った。

第1ステップのPCRに供試したプライマー:

フォワードプライマー: 5' —AACGTGCGGATGGATCAC—3'

リバースプライマー: 5' —CTACGCCAAACGACTAATTCTG—3'

第2ステップのPCRに供試したプライマー:

フォワードプライマー: 5' —AACGTGCGGATGGATCAC—3'

リバースプライマー: 5' —TCTAAAGAAATTGTTTAGAG—3'

【0057】

生体試料として実施例3の唾液を用いた。第1ステップおよび第2ステップのPCRとも40サイクルの増幅を行った。それ以外は実施例1と同様の操作を行った。電気泳動の結果を図6に示した。図中のレーン1はマーカー、レーン2は被験者A、レーン3は被験者B、レーン4は被験者C、レーン5は被験者D、レーン6は被験者Eからの採取試料の電気泳動像を示す。5名中3名に増幅産物を示すバンドが検出された。

【0058】

＜実施例 6＞生体試料のネスティブ PCR の実施

下記のプライマーを用いて、2 段階の PCR から成るセミネスティブ PCR を行った。

第 1 ステップの PCR に供試したプライマー：

フォワードプライマー：5' — CGTCACACCACGAGAGTTGG — 3'

リバースプライマー：5' — CTACGCCAAACGACTAATTCG — 3'

第 2 ステップの PCR に供試したプライマー：

フォワードプライマー：5' — AACGTGCGGATGGATCAC — 3'

リバースプライマー：5' — TCTAAAGAAATTGTTTAGAG — 3'

結果は実施例 5 と同様であった。

【0059】

＜実施例 7＞F n 菌に特異的なプローブを用いた DNA チップ

実施例 1 において得られたプローブを常法により蛍光標識し、ガラス板に吸着させた。これを実施例 3 の唾液試料から得られた DNA と反応させた。結果を表 2 に示した。

【0060】

【表 2】

被験者	F n 菌の検出
A	検出
B	検出
C	検出
D	検出せず
E	検出せず

【0061】

<実施例 8> F n 菌に特異的なプローブを用いた検出キット

実施例 1 において得られたプローブを常法により蛍光標識し、ガラスビーズに吸着させた。これを実施例 3 の唾液試料から得られた DNA と反応後、常法に従って発色させた。結果を表 3 に示した。

【0062】

【表 3】

被験者	F n 菌の検出
A	検出
B	検出
C	検出
D	検出せず
E	検出せず

【0063】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kao Corporation

<120> detection of Fusobacterium nucleatum

<130> 020962JP

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 883

<212> DNA

<213> Fusobacterium nucleatum

<400>

```

aacgtgcgga tggatcacct cctttctaag gagaatgtgt ctttctctat tctattggta      60
atgttcttac attacttctg aacattggaa actatatagt agaacaaca agaaaaaaat      120
taactctaaa caatttcttt agagtttagct tgncaaaaaa taggttaaaa taattaaggg      180

```


cacacaaagg atgcctaggt agtaagagcc gatgaaggac gtggtaagct gcgataagcc 240
tagataagtt gcaatcgaac gtaagagtct aggatttccg aatggagcaa tctattaaga 300
tggagtctta atacgaaaga gggaaccgcg tgaactgaaa catctaagta acgcgaggaa 360
aagaaagtaa aaacgatacc caaagtagcg gcgagcgaac tgggtcaagc ctaaacctta 420
aatatgtcaa ggatacagcc gttgtattta aggggtagag ggacaaagta gtgaagaact 480
gtaagatatt caatatagtg tattgatgaa ttagaattgt ctggaaagat gaaccgcaga 540
aggtgaaagt cctgtataag taaatcctta cacatataac tttgctccca agtaacatgg 600
aacacgagga attctgtgtg aatcagtgag gaccaaactt cataaggcta aatactctta 660
ctaaccgata gcgcatagta ccgtgaggga aaggtgaaaa gaacccttgg aggggagtg 720
aatagaacct gaaatttgtg gcttacaagc ggtagagacc catttggtg atggcgtgcc 780
ttttggagaa tgatcctgcg agttacgtta aacggcgagg ttaagtataa cggagccgaa 840
gggaaaccaa gtcttaatag ggcaattag tcgtttggcg tag 883

<210> 2

<211> 1502

<212> DNA

<213> *Fusobacterium nucleatum*

<400>

attgaacgaa gagtttgatc ctggctcagg atgaacgctg acagaatgct taacacatgc 60
aagtctactt gaatttgggt tttttaactt cgatttgggt ggcggacggg tgagtaacgc 120
gtaaagaact tgcctcacag ctagggacaa catttggaac cgaatgctaa tacctgatat 180
tatgattata gggcatccta gaattatgaa agctatatgc gctgtgagag agctttgcgt 240
cccattagct agttggagag gtaacggctc accaaggcga tgatgggtag ccggcctgag 300
agggtgaacg gccacaaggg gactgagaca cggcccttac tcctacggga ggcagcagtg 360
gggaatattg gacaatggac cgagagtctg atccagcaat tctgtgtgca cgatgacgtt 420
tttcggaatg taaagtgtt tcagttggga agaaaaaat gacggtacca acagaagaag 480
tgacggctaa atacgtgcca gcagccgcg taatacgtat gtcacgagcg ttatccggat 540
ttattgggcg taaagcgcgt ctaggtgggt atgtaagtct gatgtgaaaa tgcagggctc 600
aactctgtat tgcgttggaa actgtgtaac tagagtactg gagaggtaag cggaactaca 660
agtgtagagg tgaaattcgt agatatattgt aggaatgccg atggggaagc cagcttactg 720

gacagatact gacgctgaag cgcgaaagcg tgggtagcaa acaggattag ataccctggt 780
agtcacgcc gtaaacgatg attactaggt gttgggggtc gaacctcagc gccaagcaa 840
acgcgataag taatccgcct ggggagtagc tacgcaagta tgaaactcaa aggaattgac 900
ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga cgcaacgcga ggaaccttac 960
cagcgtttga catcttagga atgagacaga gatgtttcag tgtcccttcg gggaaaccta 1020
aagacaggtg gtgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc 1080
aacgagcgca acccctttcg tatgttacca tcattaagtt ggggactcat gcgatactgc 1140
ctacgatgag taggaggaag gtggggatga cgtcaagtca tcatgccct tatacgtgg 1200
gctacacacg tgctacaatg ggtagaacag agagttgcaa agccgtgagg tggagctaat 1260
ctcagaaaac tattcttagt tcggattgta ctctgcaact cgagtacatg aagttggaat 1320
cgctagtaat cgcgaaacag caatgtcgcg gtgaatacgt tctcgggtct tgtacacacc 1380
gcccgtcaca ccacgagagt tggttgcacc tgaagtagca ggcctaaccg taaggaggga 1440
tgttccgagg gtgtgattag cgattgggt gaagtcgtaa caaggtatcc gtacgggaac 1500
gt 1502

<210> 3

<211> 152

<212> DNA

<213> *Fusobacterium nucleatum*

<400>

aacgtgcgga tggatcacct cctttctaag gagaatgtgt ctttctctat tctattggta 60
atgttcttac attacttctg aacattggaa actatatagt agaacaaca agaaaaaat 120
taactctaaa caatttcttt agagttagct tg 152

【図面の簡単な説明】

【図 1】

rRNA をコードする DNA の構成を示す図である。

【図 2】

実施例 1 におけるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の PCR 増幅産物の電気泳動像である。

【図 3】

実施例 2 におけるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌の P C R 増幅産物の電気泳動像である。

【図 4】

フゾバクテリウム・ニュークレタム菌以外のフゾバクテリウム属細菌とヒト由来細胞における増幅産物の電気泳動像である。

【図 5】

生体試料における P C R の結果である。(1) 唾液、(2) 舌苔、(3) 歯肉縁下歯垢、(4) 口腔粘膜

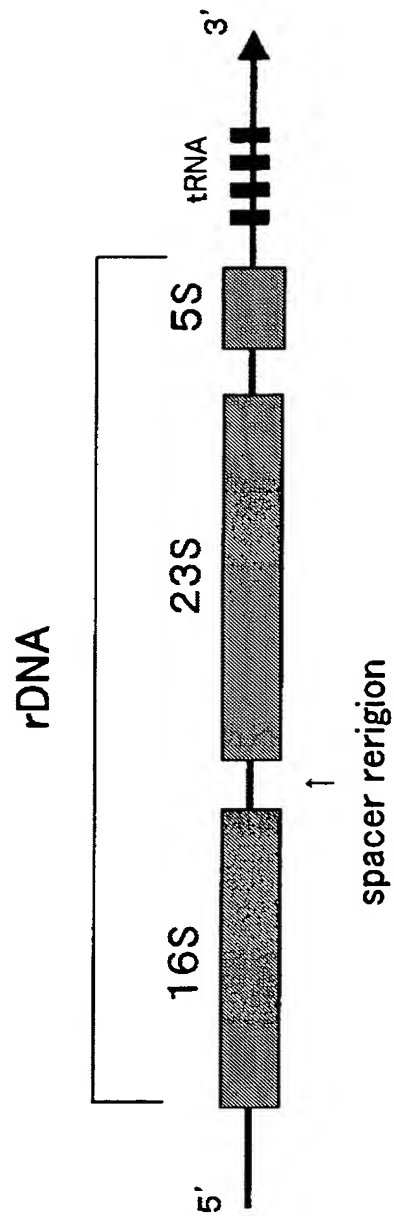
【図 6】

生体試料におけるセミネスティット P C R の結果である。

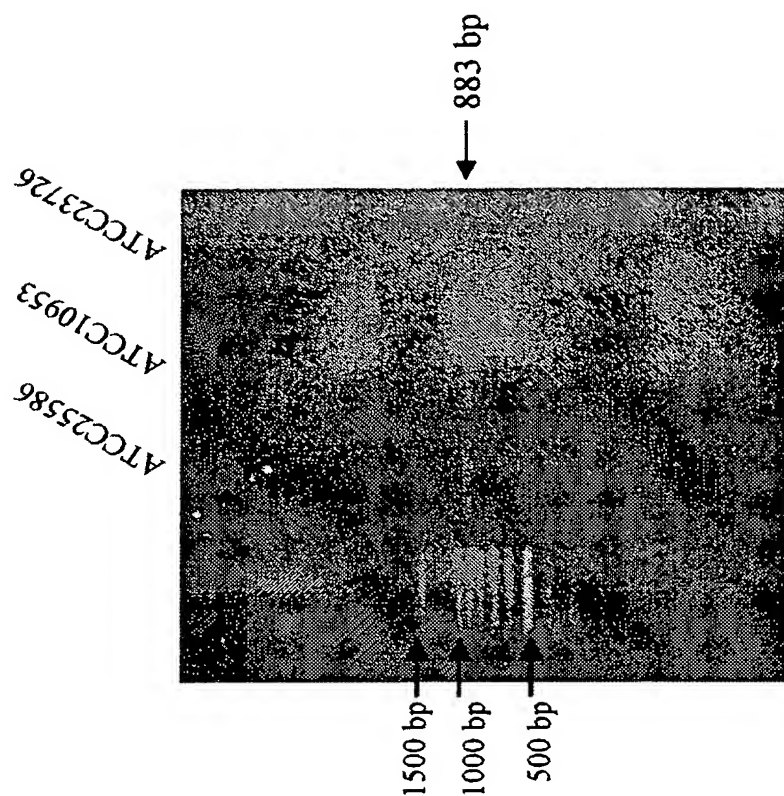
【書類名】

図面

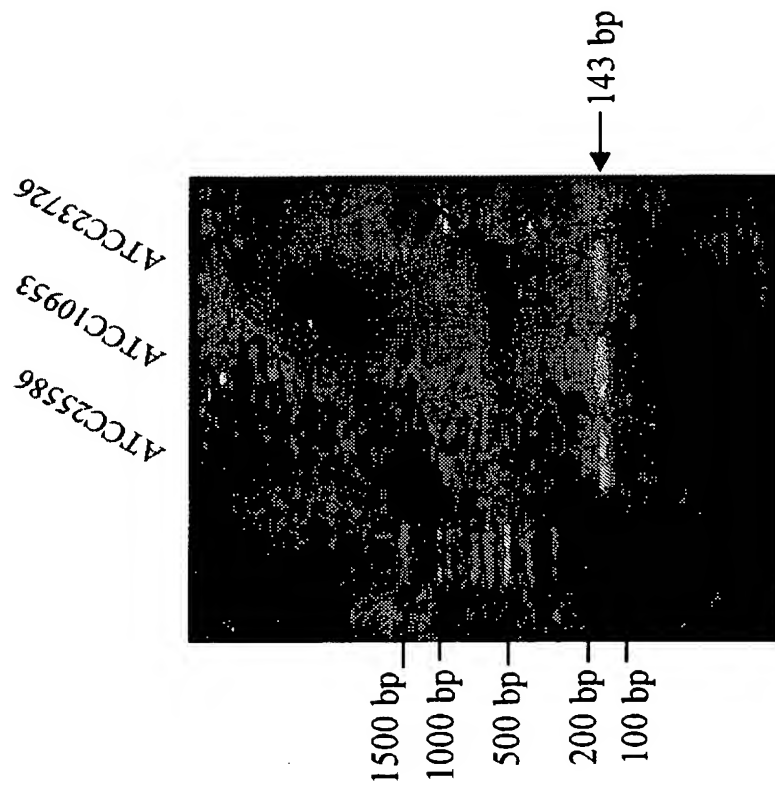
【図 1】



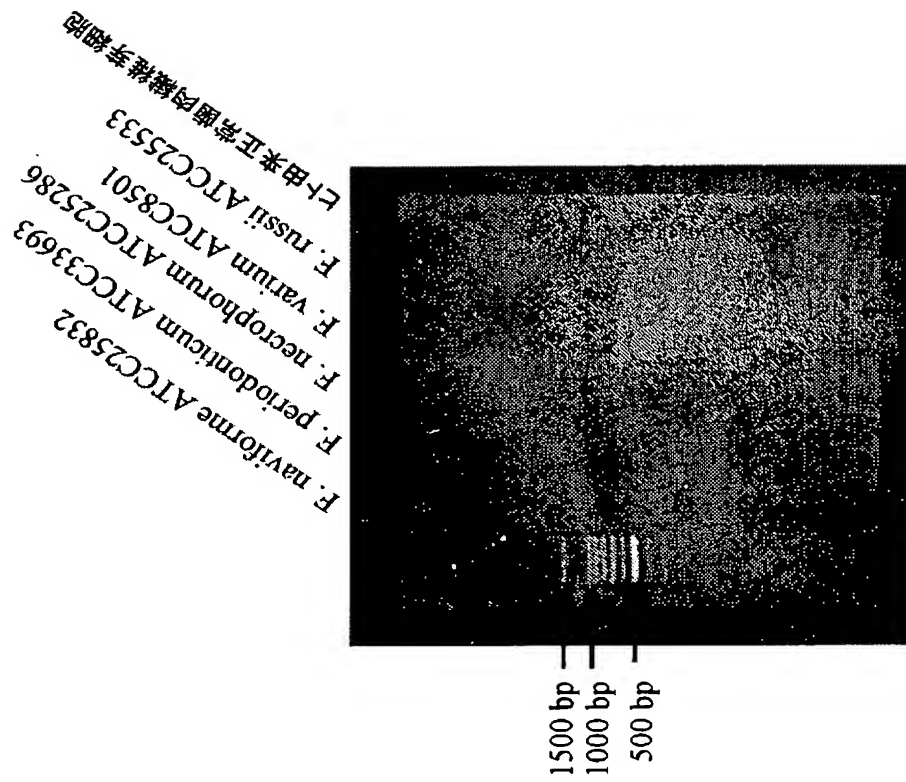
【図 2】



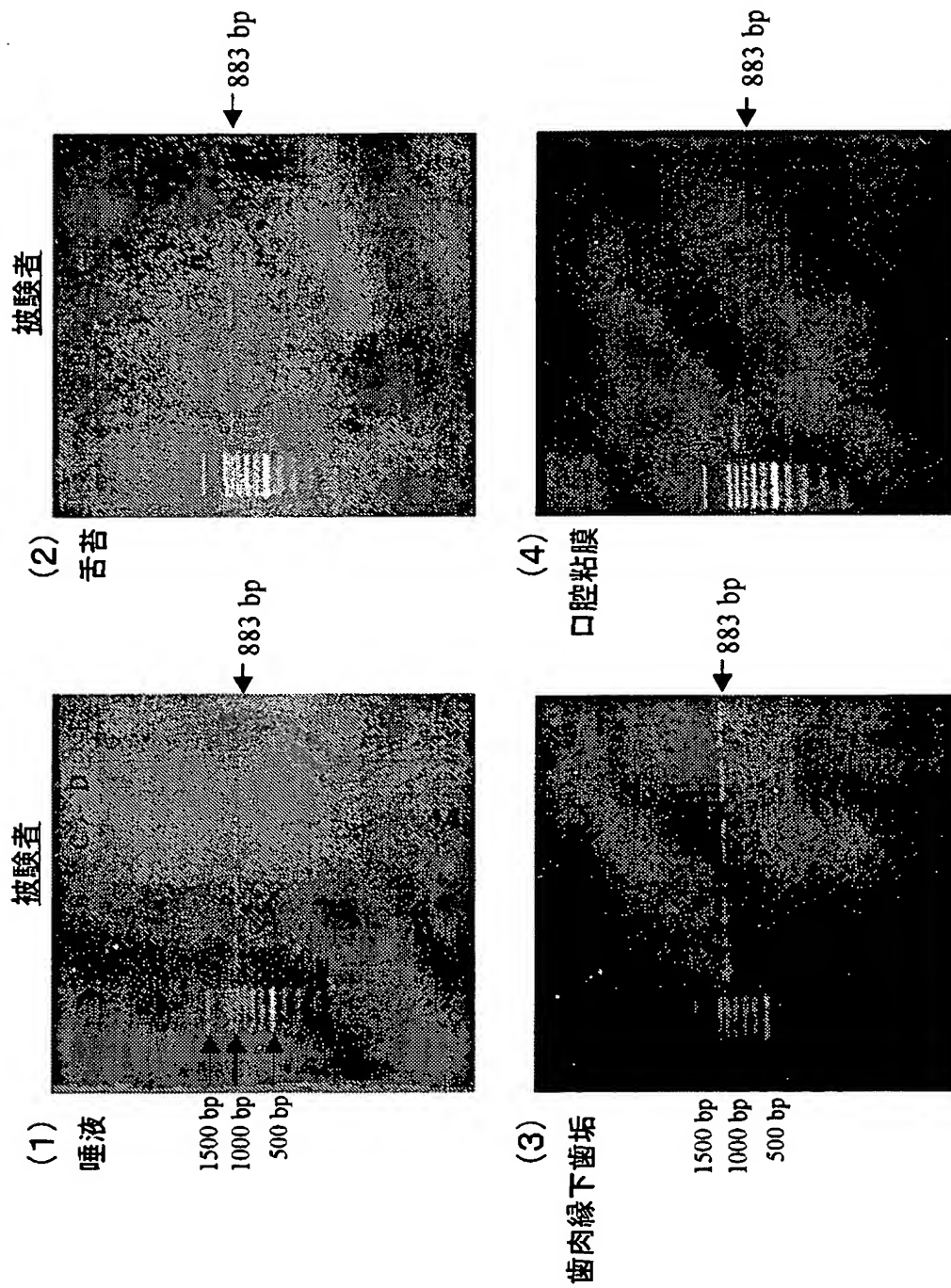
【図 3】



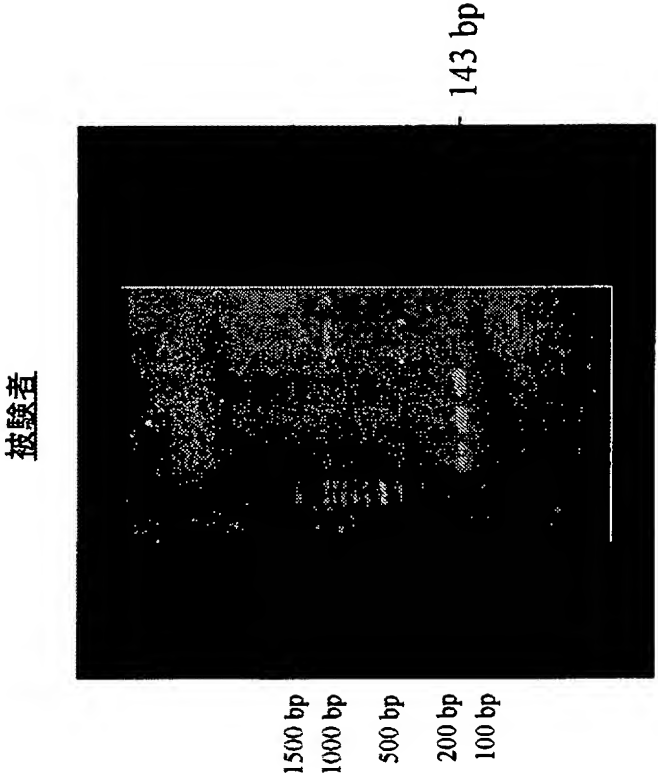
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、生体試料中から化膿性疾患関連細菌及び口臭原因菌であるフゾバクテリウム・ニュークレタム菌を特異的に検出する方法を提供する。

【解決手段】 下記塩基配列のうち（A）と（B）、もしくは（A）と（D）を組み合わせたプライマー対を用いてPCRを行う。（A）配列番号1に記載の塩基番号第1番目乃至第39番目の塩基配列に含まれる、10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列（B）配列番号1に記載の塩基番号第863番目乃至883番目の塩基配列の相補的塩基配列、（D）配列番号1に記載の塩基番号第124番目乃至156番目の塩基配列に含まれる、10塩基以上の連続したヌクレオチドからなる塩基配列の相補的塩基配列。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 3 5 8 6 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名

花王株式会社